

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 660 933**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)
②1 N° d'enregistrement national : **90 04754**

⑤1 Int Cl⁵ : C 12 Q 1/25, 1/32, 1/68; G 01 N 33/573, 33/577

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 12.04.90.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 18.10.91 Bulletin 91/42.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *INSTITUT PASTEUR Fondation
privée reconnue d'utilité publique — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : Lacombe Marie-Lise, Wallet Valérie et
Veron Michel.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Gutmann Ernest/Plasseraud Yves S.A.

⑤4 Moyens pour la détection de cellules hautement prolifératives.

⑤7 L'invention a pour objet une méthode pour la détection
de cellules fortement prolifératives telles les cellules tumo-
rales et un kit dans laquelle on mesure l'activité ou la quan-
tité de NDP kinases.

FR 2 660 933 - A1



MOYENS POUR LA DETECTION DE CELLULES HAUTEMENT
PROLIFERATIVES

L'invention a pour objet une méthode pour la
5 détection de cellules fortement prolifératives telles les
cellules tumorales et un kit permettant la mise en oeuvre
d'une telle méthode.

A l'heure actuelle, la détection de tumeurs fait
appel le plus souvent à des examens histologiques des
10 cellules transformées qui nécessitent un personnel
hautement qualifié pour apprécier les résultats. De plus,
peu de marqueurs fiables de cellules tumorales sont
actuellement disponibles.

L'étude de tumeurs par les inventeurs, notamment de
15 tumeurs du sein, a montré une augmentation importante de
l'activité et du taux d'enzymes intervenant dans la
synthèse des nucléotides.

La mesure de l'activité ou du taux de l'enzyme a pu
être corrélée de manière reproductible à l'état tumoral
20 des échantillons biologiques testés.

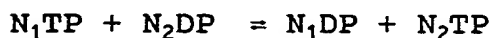
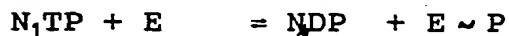
L'invention a donc pour but de fournir une méthode
de détection de cellules hautement prolifératives, en
particulier, elle vise à fournir une méthode pour mettre
en évidence un état tumoral potentiellement évolutif en
25 mesurant l'activité ou le taux d'enzymes particulières.

Selon un autre aspect, l'invention vise à fournir un
kit de diagnostic pour la mise en oeuvre de cette
méthode.

La méthode, selon l'invention, pour la détection de
30 cellules fortement prolifératives, est caractérisée en ce
qu'elle comprend la mesure in vitro de l'activité ou de
la quantité de NDP kinases d'un échantillon biologique.

On sait que les nucléosides diphosphate kinases (NDP
kinases; EC 2.7.4.6.) jouent un rôle majeur dans la
35 synthèse des nucléosides triphosphates (pour une revue:

AGARWAL & PARKS, 1973). Ces enzymes catalysent le transfert du groupement γ -phosphate d'un triphosphonucléoside donneur sur un nucléoside diphosphate accepteur
 5 par un mécanisme ping-pong comportant un intermédiaire phosphorylé stable comme représenté ci-après :



15 (N₁ et N₂ sont des ribo et déoxyribonucléosides et E.P, l'intermédiaire phosphorylé)

Leur spécificité vis-à-vis des substrats
 20 nucléotidiques est assez large puisqu'elles peuvent utiliser indifféremment les dérivés puriques et pyrimidiques et aussi bien les dérivés riboses que déoxyriboses. Elles forment des polymères constitués d'un seul ou de deux types de monomères associés le plus
 25 souvent en hexamères.

Les inventeurs ont observé que les variations d'activité ou de taux de NDP kinases traduisent un état tumoral potentiellement évolutif.

La mesure de l'activité des NDP kinases est réalisée
 30 avantageusement en utilisant comme substrats des nucléotides naturels ou des analogues de synthèse de ces nucléotides et en mettant en évidence les nucléotides produits par des systèmes enzymatiques couplés permettant la formation de produits détectables par colorimétrie
 35 et/ou spectrophotométrie.

Ainsi, on utilise par exemple un système hexokinase-glucose-6-phosphate déshydrogénase, reliant la formation par la NDP kinase d'ATP à partir d'ITP (inosine triphosphate) et d'ADP, à la formation de la NADPH+H⁺, produits détectables spectrophotométriquement directement à 340 nm ou dans le spectre visible après la réaction avec la phénazine méthosulfate et le nitrobleu de tétrazolium (CHENG et al, 1971, Biochemistry 10, 2139).

10 En variante, on mesure la quantité de NDP kinase par marquage de l'intermédiaire phosphorylé résultant de l'interaction du nucléotide triphosphate substrat avec l'enzyme, le marquage de l'intermédiaire phosphorylé étant effectué à l'aide d'analogues tels les dérivés
15 γthiophosphates de l'ATP ou du GTP qui présentent l'avantage de ne pouvoir être hydrolysés par les phosphatases.

L'activité NDP kinase peut également être suivie en utilisant des nucléotides naturels ou des analogues de
20 synthèse radioactifs et des techniques de séparation des produits de la réaction par chromatographie (PARKS & AGARWAL, 1973, in The enzymes (BOYER P.D. Ed), 8, 307, Academic Press, NY).

Selon un autre mode de réalisation de l'invention,
25 comme l'augmentation d'activité observée correspond à un taux plus important d'enzyme, on mesure la quantité de NDP kinases présentes à l'aide d'anticorps anti-NDP kinases polyclonaux ou monoclonaux et on met en évidence une réaction éventuelle du type antigène-anticorps à
30 l'aide de systèmes révélateurs classiques. Cette détection peut être effectuée sur coupe histologique ou après électrophorèse de l'échantillon et transfert de WESTERN.

Les systèmes révélateurs les plus usuels comprennent
35 des marqueurs chimiques, physiques et/ou enzymatiques

et/ou chimioluminescents détectables lorsque la réaction du type antigène-anticorps s'est produite. On citera les systèmes colorimétriques couplés à des enzymes, les
5 systèmes fluorescents ou encore radiomarqués.

Selon encore un autre mode de réalisation de l'invention, on utilise des sondes d'ADNc spécifiques de NDP kinases capables de s'hybrider avec les séquences correspondantes des ARN-m codant pour les NDP kinases,
10 une augmentation du taux des ARN-m pouvant être reliée à une augmentation de la quantité de protéines NDP kinases reflétant l'état tumoral de l'échantillon.

Avantageusement, l'activité ou la quantité de NDP kinases est mesurée sur un échantillon biologique
15 provenant d'un patient.

Pour la mise en évidence d'un état tumoral, on effectue plus spécialement une comparaison d'activité entre un échantillon biologique contenant des cellules hautement prolifératives et un échantillon contenant des
20 cellules correspondantes normales.

Par échantillon biologique, on entend tout prélèvement effectué sur le patient qu'il s'agisse d'une tumeur solide, d'un fluide biologique tel que le sang, le sérum, le liquide céphalo-rachidien, le liquide pleural,
25 l'urine, les crachats, des prélèvements obtenus par tubage, aspiration bronchique, ou ponction, ou encore des cellules circulantes.

Pour effectuer la mesure, l'échantillon biologique est utilisé sous forme entière, broyée, en coupe, fractionnée, en particulier sous forme de fractions sub-cellulaires ou, le cas échéant, sous forme de culture
30 cellulaire.

Les réactifs nécessaires à la mise en évidence de l'activité ou de la quantité de NDP kinases peuvent être

dans un milieu liquide ou incorporés dans un matériau support par exemple des gels ou des filtres-support.

L'invention vise également un kit pour la détection
5 in vitro de cellules à fort taux de prolifération.

Ce kit est caractérisé en ce qu'il renferme les réactifs nécessaires tels que définis ci-dessus pour la mise en évidence de l'activité ou de la quantité de NDP kinases mises en contact avec un échantillon biologique
10 sous forme appropriée.

Le kit de détection de l'invention présente l'avantage de pouvoir être utilisé directement sur des échantillons cliniques et permet d'obtenir des résultats dans un temps très rapide.

15 On rapporte dans les exemples ci-après donnés à titre illustratif une méthode de détection de l'activité NDP kinase mesurée sur des extraits de tissus de différents patients. Les résultats obtenus sont rapportés sur les figures 1 et 2 qui concernent les variations de
20 l'activité de la NDPK en U/mg de protéine selon le tissu étudié pour deux séries de patients.

EXEMPLES

Préparation des extraits

Les fragments de tissus obtenus congelés dans de
25 l'azote liquide sont dégelés rapidement dans du tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 maintenu à 4°C, contenant de l'EDTA 1 mM, du glycérol 20% et des inhibiteurs de protéases (PMSF (fluorure de phényl méthyl sulfonyl) 1 mM, 1 µg/ml d'antipain et 15 µg/ml de benzamidine) à
30 raison 5 ml environ de tampon par gramme de tissus. Les tissus sont coupés finement puis broyés au Polytron® (3 fois 20 secondes à puissance maximale). Le broyat est ensuite centrifugé à 4°C, 10 min. à 20000 g dans une centrifugeuse réfrigérée. Le surnageant est utilisé
35 immédiatement ou conservé par aliquots à -80°C. La

concentration en protéines de celui-ci est mesurée par la méthode de BRADFORD (1976, Anal. Biochem., 72, 248).

Dosage de l'activité NDP kinase

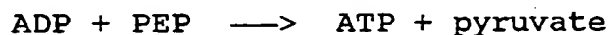
5 L'activité enzymatique est mesurée par un système enzymatique couplé pyruvate kinase-lactate deshydrogénase (AGARWAL et al, 1978, Meth. Enzymol., 51, 376) qui relie la formation d'ADP par la (ou les) NDP kinase(s) à une consommation de NADH détectée spectrophotométriquement à
10 340 nm. Les réactions sont les suivantes :

NDP kinase



15

PK



LDH

20



(Abréviations: PEP: phosphoénolpyruvate; PK: pyruvate kinase; LDH: lactate déshydrogénase; dTDP: déoxythymidine
25 diphosphate; dTTP: déoxythymidinetriphosphate)

La réaction a lieu à 30°C dans un volume total de 500 µl de Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, contenant du phosphoenolpyruvate 0,5 mM, de l'ATP 0,5 mM, du MgCl₂ 6 mM, 100
30 µg/ml de NADH, du KCl 50 mM, du dTDP 0,2 mM, 1,5 U de pyruvate kinase et de lactate deshydrogénase et la quantité de surnageant d'extrait tissulaire (1 à 10 µl) nécessaire à l'obtention d'une vitesse directement proportionnelle à la quantité d'extrait. Une unité
35

d'enzyme catalyse la formation d'une μ mole d'ADP par minute.

Résultats

5 L'activité NDP kinase d'extraits de plusieurs tumeurs solides du sein a été comparée à celle de différents tissus normaux par la méthode pyruvate kinase-lactate déshydrogénase.

10 On rapporte sur les figures 1 et 2 l'activité NDP kinase d'extraits de ganglion (GG) de muscle (Mu), de mastose (Ms), de peau (Pe), de sein normal (SN), de thyroïde (Ty) et de tumeur du sein (TS). La lettre précédent les abréviations de chaque extrait correspond au patient sur lequel a été effectué le test.

15 L'examen de ces figures montre que l'activité est augmentée de 5 à 10 fois par rapport à l'activité du tissu normal de référence.

20 L'augmentation de l'activité enzymatique correspond à une augmentation de la quantité de la protéine comme il a été évalué par transfert de WESTERN, en utilisant des anticorps spécifiques de NDP kinase d'érythrocytes humains. Ces résultats sont confirmés sur coupe de tissus par un marquage spécifique des cellules tumorales.

25 La mesure de l'activité NDP kinase constitue donc un critère d'évaluation de l'état tumoral évolutif potentiel d'un prélèvement tissulaire.

L'invention fournit ainsi un test simple de dépistage d'états tumoraux potentiellement évolutifs.

30

35

REVENDICATIONS

1. Méthode de détection in vitro de cellules à fort
taux de prolifération, telles les cellules tumorales,
5 caractérisée en ce qu'on mesure l'activité ou la quantité
de NDP kinases.

2. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en
ce qu'on réalise la mesure de l'activité des NDP kinases
en utilisant des nucléotides naturels ou des analogues de
10 synthèse de ces nucléotides, et en mettant en évidence
les produits de la réaction par des systèmes enzymatiques
couplés permettant la synthèse de produits détectables
par colorimétrie et/ou spectrophotométrie.

3. Méthode selon la revendication 1, caractérisé en
15 ce qu'on mesure la quantité de NDP kinase par marquage de
l'intermédiaire phosphorylé résultant de l'interaction du
nucléotide triphosphate substrat avec l'enzyme, le
marquage de l'intermédiaire phosphorylé étant effectué à
l'aide d'analogues tels les dérivés γ -thiophosphates de
20 l'ATP ou du GTP.

4. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en
ce qu'on réalise la mesure de l'activité des NDP kinases
en utilisant des nucléotides radioactivement marqués,
naturels, ou des analogues de synthèse de ces nucléotides
25 et qu'on sépare les produits par chromatographie.

5. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en
ce qu'on mesure la quantité de NDP kinases à l'aide
d'anticorps anti-NDP kinases polyclonaux ou monoclonaux
et qu'on met en évidence une réaction éventuelle du type
30 antigène-anticorps à l'aide de systèmes révélateurs
classiques.

6. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en
ce qu'on utilise des sondes d'ADNc spécifiques de NDP
kinases, capables de s'hybrider avec les séquences
35 correspondantes des ARN-m codant pour les NDP kinases.

7. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que l'activité ou la quantité de NDP kinase est mesurée sur un échantillon biologique
5 provenant d'un patient.

8. Méthode selon la revendication 7, caractérisée en ce que l'échantillon est une tumeur solide ou un fluide biologique, ou des cellules circulantes

9. Méthode selon la revendication 8, caractérisée en
10 ce que l'échantillon biologique est utilisé sous forme entière, broyée, en coupe, fractionnée, en particulier sous forme de fractions sub-cellulaires ou, le cas échéant, sous forme de culture cellulaire.

10. Kit pour la détection in vitro de cellules à
15 fort taux de prolifération, caractérisé en ce qu'il renferme les réactifs nécessaires à la mise en évidence de l'activité ou de la quantité de NDP kinases, mis en contact avec un échantillon biologique sous forme appropriée.

20

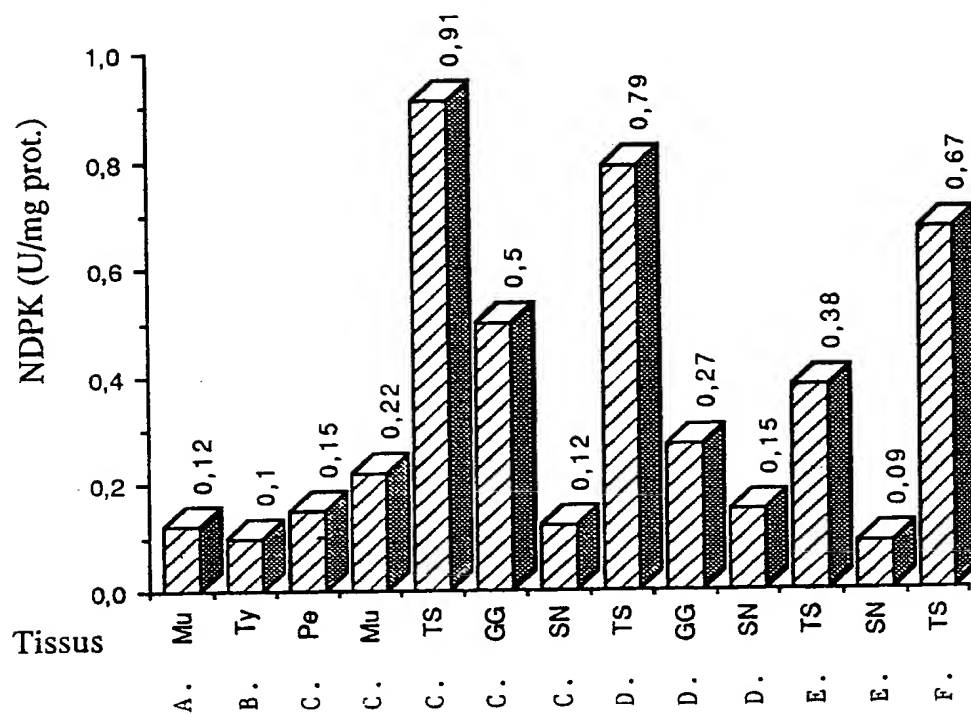
25

30

35

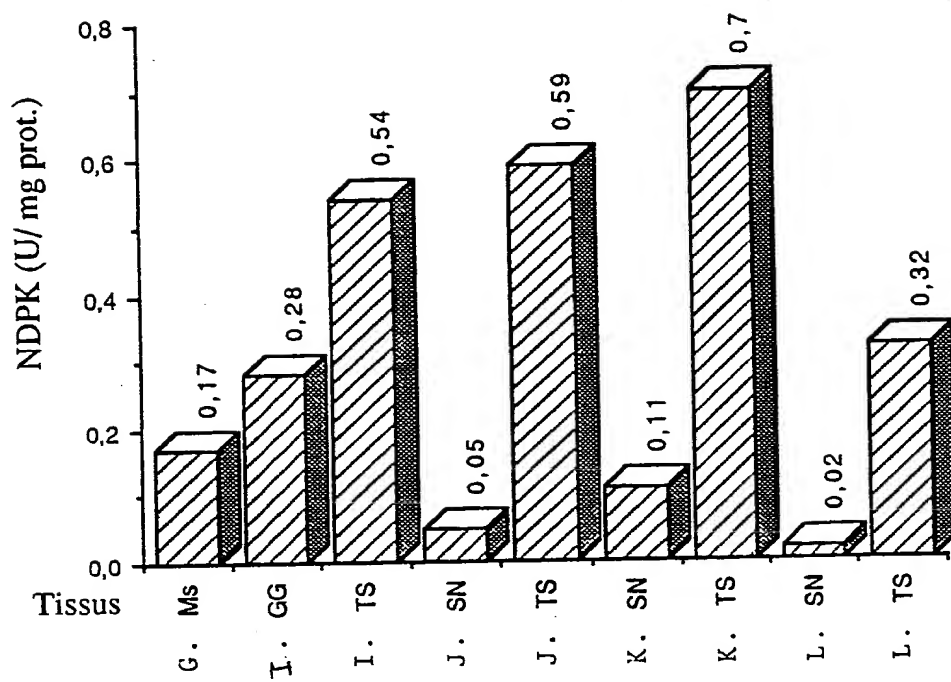
1/2

FIGURE 1



2/2

FIGURE 2



INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFR 9004754
FA 441785

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, vol. 30, no. 7, juillet 1981; pages 793-798, Pergamon Press, Oxford, GB; G.W. CRABTREE et al.: "Activities of purine-metabolizing enzymes in human colon carcinoma cell lines and xenograft tumors" * Page 796, tableaux 1,2; colonne de gauches et droites en entier; pages 797,798 en entier * ---	1-4,7-10
Y	THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY (TOKYO), vol. 95, no. 4, avril 1984, pages 925-935, Tokyo, JP; K. KOYAMA et al.: "Nucleosidediphosphate kinase from Ehrlich ascites tumor cells" * En entier * ---	1-4,7-10
Y	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 929, no. 3, mars 1987, pages 231-238, Elsevier Science Publ., Amsterdam, NL; K. OHTSUKI et al.: "Physiological correlation between nucleoside-diphosphate kinases and the 21-kDa guanine-nucleotide binding proteins copurified with the enzymes from the cell membrane fractions of Ehrlich ascites tumor cells" * Page 231, en entier - page 232, colonne de gauche, lignes 1-34; page 235, colonne de gauche, lignes 3-16 * --- -/-	1-4
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		C 12 Q G 01 N C 07 K
Date d'achèvement de la recherche 16-11-1990		Examineur DOEPFER K-P.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ----- & : membre de la même famille, document correspondant		

EPO FORM 1503 03.82 (P0413)

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFR 9004754
FA 441785

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	S. FERRONE et al.: "Handbook of monoclonal antibodies", 1985, page 133, Noyes Publications, Park Ridge, New Jersey, US; F. CELADA et al. * Chapitre 9: "Monoclonal antibodies in enzymology" * -----	5
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
Date d'achèvement de la recherche 16-11-1990		Examinateur DOEPFER K-P.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

EPO FORM 1503 03.82 (P0413)